

Requested Patent: JP7196527A

Title: PEPTIDE OR ITS DERIVATIVE AND CELL GROWTH ACTIVATOR ;

Abstracted Patent: JP7196527 ;

Publication Date: 1995-08-01 ;

Inventor(s): SHIMAMURA SEIICHI; others: 03 ;

Applicant(s): MORINAGA MILK IND CO LTD ;

Application Number: JP19930352422 19931229 ;

Priority Number(s): ;

IPC Classification: A61K38/00; A61K7/06; A61K38/22; C07K7/06; C07K7/08 ;

Equivalents: ;

ABSTRACT:

PURPOSE:To obtain a new peptide having functions to activate the cell growth and a cell growth activator, containing the peptide and having enhanced effects.

CONSTITUTION:This peptide has any of amino acid sequences expressed by formulas I to VII or its derivative. This cell growth activator is obtained by blending the peptide, its derivative or a mixture thereof with an epidermal growth factor as active ingredients and more effective than a medicine of the epidermal growth factor alone. Both the ingredients in the activator are contained at concentrations of the peptide within the range of 0.1µg to 100mg/g peptide and the epidermal growth factor within the range of 0.01ng to 10µg/g. The peptide is obtained by hydrolyzing lactoferrins as a raw material with an acid or an enzyme and isolating the peptide from the resultant hydrolyzate. For example, the peptide is prepared by hydrolyzing a bovine lactoferrin with pepsin, dissolving the resultant hydrolyzate in water and isolating the peptide based on a linear gradient obtained from a mixture of a 0.5% aqueous solution of trifluoroacetic acid with a 90% aqueous solution of acetonitrile containing 0.041% trifluoroacetic acid at different concentrations of both the solutions using a column filled with ODS120-T(R) (manufactured by Tosoh Corp.).

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-196527

(43) 公開日 平成7年(1995)8月1日

(51) Int.Cl.⁶

A 6 1 K 38/00

識別記号

ADT

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

7/06

A 6 1 K 37/ 02

ADT

37/ 18

審査請求 未請求 請求項の数3 F D (全 11 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号

特願平5-352422

(22) 出願日

平成5年(1993)12月29日

(71) 出願人 000006127

森永乳業株式会社

東京都港区芝5丁目33番1号

(72) 発明者 島村 誠一

神奈川県横浜市港北区篠原町1558

(72) 発明者 福渡 康夫

神奈川県川崎市麻生区虹ヶ丘3-1-4-

103

(72) 発明者 篠田 一三

神奈川県座間市東原5-1-15-104 さ

がみ野さくら

(74) 代理人 弁理士 西澤 利夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ペプチドまたはその誘導体と、細胞増殖賦活化剤

(57) 【要約】

【目的】 細胞増殖賦活作用のある新規なペプチド類、その誘導体、および従来のEGFが単独添加された薬剤よりも、さらに効果的な細胞増殖賦活化剤を提供する。

【構成】 配列番号1から配列番号7のアミノ酸配列を有するペプチドまたはその誘導体。配列番号1から配列番号7のペプチド、その誘導体またはそれらの混合物と上皮細胞成長因子とを有効成分として含有する細胞増殖賦活化剤。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1から配列番号7のいずれかのアミノ酸配列を有するペプチドまたはその誘導体。

【請求項2】 配列番号1から配列番号7のいずれかのアミノ酸配列を有するペプチド、その誘導体またはそれらの混合物と上皮細胞成長因子とを有効成分として含有する細胞増殖賦活化剤。

【請求項3】 ペプチド、その誘導体またはそれらの混合物が、少なくとも0.1 μ g/gの割合で含有されている請求項2の細胞増殖賦活化剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】この発明は、ペプチドまたはその誘導体と、細胞増殖賦活化剤に関するものである。さらに詳しくは、この発明は特定のアミノ酸配列を有する新規なペプチドまたはその誘導体と、皮膚、毛髪、消化管上皮等の細胞の増殖賦活化剤に関するものである。

【0002】

【従来の技術】ラクトフェリン (lactoferrin、以下Lfと記載することがある) は、母乳中に極めて多量に含まれている分子量約80,000の鉄結合性蛋白質であって、大腸菌、カンジダ菌、クロストリジウム菌、ブドウ球菌等の有害微生物に対して抗菌作用を示すことが知られている [ジャーナル・オブ・ペディアトリクス (Journal of Pediatrics)、第94巻、第1ページ、1979年、およびジャーナル・オブ・デューリー・サイエンス (Journal of Dairy Science)、第67巻、第60ページ、1984年]。

【0003】また最近では、ラット小腸上皮クリプト細胞およびマウス線維芽細胞Balb/c3T3のDNA合成がLfにより促進されることが明らかにされ [ペディアトリック・リサーチ (Pediatric Research)、第21巻、第563ページ、1987年、およびアグリカルチャル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー (Agricultural and Biological Chemistry)、第53巻、第31ページ、1989年]、新たな細胞増殖刺激因子として注目されている。

【0004】Lfおよびその分解物については、抗菌性およびチロシナーゼ活性阻害 (ヨーロッパ特許公開第438750号)、細胞への病原菌付着防止 (特開平3-220130号公報)、抗ウイルス作用 (特開平1-233226号公報) 等が知られてもいる。

【0005】一方、細胞増殖活性を有するペプチドとしては、いわゆる細胞成長因子が知られており (日本組織培養学会編、「細胞成長因子」、朝倉書店、1984年および日本組織培養学会編、「細胞成長因子Part I」、朝倉書店、1987年)、たとえば、上皮細胞成長因子 (epidermal growth factor、EGF)、血小板由来成長因子 (platelet-derived growth factor、PDGF)、インシュリン様成長因子 (Insulin-like growth

h factor、IGF)、塩基性線維芽細胞成長因子 (basic fibroblast growth factor、bFGF)、酸性線維芽細胞成長 (acidic fibroblast growth factor、aFGF) 等が公知となっている。

【0006】このうちEGFは、多種多様な細胞に対して細胞増殖作用を有する分子量約6,000のペプチドであり、哺乳類のすべての体液中に含まれている。EGFの発見は1962年と極めて古く、以来様々な応用研究が盛んに行われ、EGFに創傷治癒効果があること [ジャーナル・オブ・サージカル・リサーチ (Journal of Surgical Research)、第33巻、第164ページ、1982年、およびジャーナル・オブ・エクスペリメンタル・メディシン (Journal of Experimental Medicine)、第163巻、第1319ページ、1986年]、EGFが角膜損傷の治癒に有効であること [エクスペリメンタル・アイ・リサーチ (Experimental Eye Research)、第40巻、第47ページ、1985年、およびインベスティグイティブ・オブサルモロジー・アンド・ビジュアル・サイエンス (Investigative Ophthalmology & Visual Science)、第26巻、第105ページ、1985年] 等が明らかにされている。

【0007】これらの知見に基づき、EGFを皮膚用剤に応用した例も知られている。すなわち、皮膚に対しては、皮膚細胞の賦活化、新陳代謝の促進、創傷治癒効果等により、滑らかでしっとりした若々しい肌を与え、毛髪に対しては、毛母細胞の賦活化、毛髪の成長促進、抜毛防止効果等により養毛、育毛および脱毛防止作用を与える皮膚用剤が提案されている (特開昭61-5006号公報)。

【0008】また、近年、食品蛋白質の加水分解物から種々の生理活性ペプチドが単離され、栄養面での本来の機能に加え、食品蛋白質には潜在的調節因子が含まれていると考えられるようになってきた。たとえば、牛カゼインの加水分解物からマウス線維芽細胞Balb/c3T3のDNA合成を促進する細胞増殖活性ペプチドが単離され、構造が決定され、ウシ β -カゼインの第177位から第183位のヘプタペプチド (Ala-Val-Pro-Tyr-Pro-Gln-Arg) に相当することが明らかにされている (化学と生物、第25巻、第207ページ、1987年)。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】従来、EGFを有効成分として含有する創傷治癒剤、皮膚用剤等が知られていたが、それらの効果は必ずしも十分なものではなかった。

【0010】この発明の発明者等は、ラクトフェリン類の加水分解物の生物学的活性について研究を行っていたが、ウシLfの加水分解物中に、抗菌性を有するペプチドとは全く異なり、かつEGFの作用を増強し得るペプチドが存在することを発見し、そのペプチドを単離して

3

アミノ酸配列を初めて明らかにした。

【0011】この発明は、以上のとおりの新規な事実に基づいてなされたものであり、細胞増殖賦活化作用を有する新規なペプチドまたはその誘導体を提供することを目的としている。

【0012】またこの発明は、従来のEGF単独添加の薬剤よりも、さらに効果的な細胞増殖賦活化剤を提供することを目的としている。

【0013】

【課題を解決するための手段】この発明は、上記の課題を解決するものとして、配列番号1から配列番号7のいずれかのアミノ酸配列を有するペプチドまたはその誘導体を提供する。

【0014】またこの発明は、配列番号1から配列番号7のいずれかのアミノ酸配列を有するペプチド、その誘導体またはそれらの混合物と上皮細胞成長因子とを有効成分として含有する細胞増殖賦活化剤をも提供する。

【0015】なお、この発明の細胞増殖賦活化剤においては、上記ペプチド、その誘導体またはその混合物が、少なくとも0.1 μ g/gの割合で含有されていることを望ましい態様としてもよい。

【0016】以下、この発明について詳しく説明する。

【0017】この発明のペプチドまたはその誘導体（以下、これらをペプチド類と記載することがある）の製造について例示すれば、次のとおりである。まず、ペプチド類製造のための出発物質としてラクトフェリン類を使用する。このラクトフェリン類は、市販のLf、獣乳、人乳から常法により分離されるLf、これらのLfから常法により鉄を除去したアポラクトフェリン、アポラクトフェリンに常法により鉄、銅、亜鉛、マンガン等の金属を完全にまたは一部キレートさせた金属飽和、または金属部分飽和ラクトフェリン、またはこれらの混合物のいずれであってもよい。

【0018】次いでラクトフェリン類を酸または酵素で加水分解する。酸による加水分解は、ラクトフェリン類を0.1~20%、望ましくは5~15%の濃度で水または精製水等に溶解し、得られた溶液に塩酸、リン酸等の無機酸、またはクエン酸等の有機酸を添加し、溶液のpHを1~4、望ましくは2~3に調整する。次いで、このようにして得られた溶液を、調整されたpHに応じて適当な温度で所定時間加熱して加水分解する。例えば、pHが1~2に調整された場合には80~130℃、望ましくは90~120℃で、pH2~4に調整された場合には100~130℃、望ましくは100~120℃で、それぞれ1~120分間、望ましくは5~60分間加熱する。

【0019】酵素により加水分解する場合には、ラクトフェリン類を0.5~20%、望ましくは5~15%の濃度で水、精製水等に溶解し、得られた溶液を使用酵素の至適pHに調整して加水分解する。使用する酵素には

4

特に制限がなく、市販の酵素、例えばモルシンF（商標、盛進製薬社製。至適pH2.5~3.0）、豚ペプシン（和光純薬社製。至適pH2~3）スミチームAP（商標、新日本化学社製。至適pH3.0）、アマノM（商標、アマノ製薬社製。至適pH3.0）、アマノA（商標、アマノ製薬社製。至適pH7.0）、トリプシン（ノボ社製。至適pH8.0）等を単用または任意に併用するが、特に豚ペプシン、スミチームAPが望ましい。前記の酵素の他に、例えば、市販のエキソペプチダーゼを含有する醤油酵素（田辺製薬社製）を組み合わせることもできる。使用する酵素の量は、基質に対して0.1~5.0%の範囲、特に、0.5~3.0%が望ましい。

【0020】すなわち、この酵素による加水分解は、具体的には、ラクトフェリン類の溶液のpHを調整し、上記の酵素を適量添加した後、得られた溶液の温度を15~55℃、望ましくは30~50℃で30~600分間、望ましくは60~300分間保持してラクトフェリン類を加水分解する。次いで溶液をそのまま、または中和した後、酵素を常法により加熱失活する。

【0021】得られたラクトフェリン類の加水分解物から、例えば次のようにしてこの発明のペプチドを単離することができる。すなわち、ウシラクトフェリンをペプシンで加水分解した分解物を水（MilliQ水）に溶解し、ODS120-T（東ソー社製）を充填したカラム（4.6mm \times 150mm）により、0.5%トリフルオロ酢酸水溶液（A液）と0.041%トリフルオロ酢酸を含む90%アセトニトリル水溶液（B液）の直線濃度勾配により単離する。さらに詳細には、ウシラクトフェリンのペプシン加水分解物のMilliQ水溶液（10mg/ml）0.1mlを、A液とB液が80%対20%の混合率（A液：B液=80：20）で平衡化したODS120-Tに1分当たり0.8mlの流速で通液し、5分後、30分間でB液の濃度を60%まで増加する直線濃度勾配（A液対B液の比率を80対20から、A液対B液の比率を40対60）にかけ（この間の流速も0.8ml/分である）、通液開始後、3分から7分（フラクション1）、7分から10分（フラクション2）、14分から18分（フラクション3）、18分から21分（フラクション4）、および21分から23分（フラクション5）の間に溶出されるペプチドを分取する。活性ペプチドはフラクション2に含まれるので、フラクション2を濃縮し、乾燥し、MilliQに溶解し、再度前記の逆相高速液体クロマトグラフィーにより、同一条件で活性ペプチドを精製する。

【0022】次にこの発明のペプチドのアミノ酸配列の同定について説明する。

【0023】以上のようにしてウシLfの加水分解物から単離したペプチドを6規定塩酸で加水分解し、アミノ酸分析計を用いて常法によりアミノ酸組成を分析した。

また、同一の試料を気相式シーケンサー（アブライド・バイオシステムズ社製）を用いてエドマン分解を行い、アミノ酸残基の配列を決定した。その結果、このペプチドは、配列番号1に示すアミノ酸配列を有し、ウシLfのN末端から第79位～第93位に相当するペンタデカペプチドであることが、この発明の発明者らにより初めて明らかにされた。

【0024】この発明のペプチドを化学的に合成する例を示せば次のとおりである。ペプチド自動合成装置（例えば、ファルマシアLKBバイオテクノロジー社製、LKB 10 Biolynx 4170）を用い、シェパード等【ジャーナル・オブ・ケミカル・ソサイエティ・パーキン I（Journal of Chemical Society Perkin I）、第538ページ、1981年】による固相ペプチド合成法に基づいて合成する。アミン官能基を9-フルオレニルメトキシカルボニル（Fmoc）基で保護したアミノ酸（以下Fmoc-アミノ酸と略記する）に、N、N'-ジシクロヘキシルカルボジミドを添加して所望のアミノ酸の無水物を生成させ、このFmoc-アミノ酸無水物を合成に用いる。ペプチド鎖を製造するためにC-末端のアミノ酸残基に相当するFmoc-アミノ酸無水物を、そのカルボキシル基を介し、ジメチルアミノピリジンを触媒としてウルトロシンA樹脂（ファルマシアLKBバイオテクノロジー社製）に固定する。次いでこの樹脂をピペリジンを含むジメチルホルムアミドで洗浄し、C-末端アミノ酸のアミン官能基の保護基を除去する。のち所望のペプチドのアミノ酸配列のC-末端から2番目のアミノ酸残基に相当するFmoc-アミノ酸無水物を前記C-末端アミノ酸残基を介して樹脂に固定された1番目のアミノ酸の脱保護アミン官能基にカップリングさせる。以下同様にして順次所望のアミノ酸を固定する。全部のアミノ酸のカップリングが終了し、所望のアミノ酸配列のペプチド鎖が形成された後、溶媒（例えば、94%トリフルオロ酢酸、5%フェノールおよび1%エタジオールからなる）で保護基の除去およびペプチドの脱離を行い、高速液体クロマトグラフ法によりペプチドを精製する。

【0025】この発明のペプチドは、前記方法の他、組換えDNA技術により製造することもでき、ラクtofフェリン類の加水分解物から単離されたもの、組換えDNA技術により製造されたもの、化学的に合成されたもの、またはこれらの混合物のいずれのものであってもこの発明の細胞増殖賦活化剤に使用できる。

【0026】また、この発明においては、配列番号1から配列番号7のいずれかのアミノ酸配列を含むペプチド、その誘導体、それらの薬理学的または食品学的に許容される塩およびそれらの2以上の混合物からなる群より選択される物質を有効成分として含有させることもできる。

【0027】このペプチドの誘導体としては、アセチル体、アミド体、およびフォスフォ体（リン酸化体）等で

ある。アセチル体は、ラクtofフェリンの加水分解物から得られたペプチドあるいは上記のように合成したペプチドを無水酢酸あるいは塩化アセチルと反応させることで調製できる。アセチルの代わりにプロピル等のいわゆる脂肪酸もペプチドに導入できる。導入には脂肪酸の酸塩化物や活性エステル体を用いる。アミド体は、上記の固相合成で用いたウルトロシンA樹脂の代わりにアミド体合成用樹脂であるウルトロシンC樹脂（ファルマシアLKBバイオテクノロジー社製）を用い合成できる。フォスフォ体（リン酸化体）は、ラクtofフェリンの加水分解物から得られたペプチド、合成したペプチド、またはそれらのアセチル体あるいはアミド体をセリンとスレオニンの側鎖をリン酸化する酵素であるプロテインキナーゼC（コスモバイオ社製）やチロシンの側鎖をリン酸化する酵素であるチロシンキナーゼ（オンコジーン・サイエンス社製）で処理することにより調製できる。

【0028】この発明において使用するEGFは公知の物質であり、常法により人尿、獣乳または人乳から単離されたもの、組換えDNA技術により製造されたもの、化学的に合成されたもの、市販品またはこれらの混合物、のいずれのものであってもよい。

【0029】この発明の細胞増殖賦活化剤は、一般的な医薬製剤の形態で実用に供することができる。使用目的に応じて各種の剤形を適宜選択することができ、粉剤、顆粒剤、カプセル剤、錠剤、液状塗布剤、ローション剤、エアゾール剤（スプレー）、軟膏剤、坐剤、注射剤等として使用し得る。

【0030】この発明のペプチドまたはその誘導体は、医薬品、化粧品および養毛剤の成分としても使用することができ、例えば、胃腸薬、目薬、外用剤等の医薬品として、化粧水、クリーム、ファンデーション、乳液等の皮膚に適用される化粧品として、またヘアークリーム、ヘアリキッド、ヘアローション、ヘアリンズ、ヘアートニック、ボマード、シャンプー等の頭皮および毛髪に適用される毛髪用化粧品として使用し得る。

【0031】この発明の細胞増殖賦活化剤のペプチドおよびEGFの濃度は、それぞれ0.1 μ g～100mg/gおよび0.01ng～10 μ g/gが望ましい範囲である。この発明のペプチドおよび細胞増殖賦活化剤に併用するEGFは、いずれも天然物であるから、それらの安全性については問題がない。

【0032】次に試験例を示してこの発明の作用効果を説明する。

試験例1

この試験は、ウシLfから得られたペンタデカペプチドのアミノ酸配列を決定するために行った。

(1) 試料の調製

実施例1と同一の方法により調製した。

(2) 試験方法

単離されたペンタデカペプチドのアミノ酸配列は以下の

とおり決定した。実施例1に示すように最終的に逆相高速液体クロマトグラフィーで単一のピークに精製したペプチド5 μ gを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液25 μ lに溶解し、ポリブレンで処理したグラスファイバーフィルターに滴下した。フィルターを乾燥し、気相式自動シーケンサー(ABI473Aプロテインシーケンサー。アプライド・バイオシステムズ社製)によりアミノ酸配列を決定した。

(3) 試験結果

このペプチドは、配列番号1に示すアミノ酸配列を有し、ウシLfのN末端から第79位~第93位に相当するペンタデカペプチドであることが明らかになった。なお、他の方法により調製したLf由来のペプチドについても同様に試験を行い、配列番号1のアミノ酸配列を有することを確認した。

試験例2

この試験は、この発明のペプチドの細胞増殖試活化活性を調べるために行った。(1) 試料の調製

実施例1と同一の方法により分画フラクション(1-5)を調整した。

(2) 試験方法

マウス線維芽細胞Swiss3T3またはラット小腸上皮細胞IEC18(共にAmerican Type Culture Collectionから購入)を96穴カルチャープレートに1穴当たり5000個ずつ蒔き、10%牛胎児血清を含むダルベッコ変法イーグル培養液(日水製薬社製。以下FBS-DMEMと略記する)で細胞がコンフルエント(細胞密度が増し細胞どうしが接触することで増殖がほぼ停止することを意味する)になるまで培養した(培養液は、1穴当たり0.1ml使用した)。培養液を0.2%FB

S-DMEMと交換し、さらに1日培養し、細胞を静止期に導入し、試験検体を含む0.2%FBS-DMEM(0.1ml)で17時間培養した。次に、培養液を³H-チミジン(ICNバイオメディカル社製。1 μ C/ml)を含む0.2%FBS-DMEM(0.1ml)*

*と交換し、さらに2時間培養した。培養液を除き、0.1%ラウリル硫酸ナトリウム水溶液を1穴当たり0.1ml加え細胞を溶解した。セルハーベスター(Skatron INC社製)によりDNAをフィルター(Skatron INC社製)上に回収し、DNAに取り込まれ³H-チミジン量を液体シンチレーションカウンタ(LKB社製)で測定した。なお、試験検体は、何も添加しない試料、分画フラクション(1~5)を50 μ g/ml添加した試料、EGFを10ng/ml添加した試料、およびEGFを10ng/mlと分画フラクション(1~5)を50 μ g/ml添加した試料である。

(3) 試験結果

この試験の結果は、表1および2に示すとおりである。表1は、マウス線維芽細胞Swiss3T3、表2は、ラット小腸上皮細胞IEC18を用いた³H-チミジンの取り込み活性試験の結果を示している。なお、結果は、実測値および無添加対照群あるいはEGFのみを添加した群の値を100%としたときの相対値で表している。

【0033】表1および表2から明らかなように、フラクション2に著しい活性が認められた。すなわち、マウス線維芽細胞Swiss3T3では(表1)、フラクション2による³H-チミジンの取り込み量は、EGF無添加の場合、対照群の152%、EGFを添加した場合は、135%であった。ラット小腸上皮細胞IEC18では(表2)、フラクション2による³H-チミジンの取り込み量は、EGF無添加の場合、対照群の108%、EGFを添加した場合は、125%であった。この結果に基づいて、試験例1に示したように、フラクション2から活性ペプチドを単離し、構造を決定した。なお、他のペプチドについてもほぼ同様な結果が得られた。

【0034】

【表1】

添 加 物	添加濃度	試 験 回 数		
	(μ g/ml)	1	2	3
対 照 (無添加) L F 分 解 物		1.00	1.00	1.00
	1	1.01	1.03	1.13
	10	1.18	1.28	1.26
	100	2.52	2.78	2.70
	1000	5.45	7.52	6.75

(注) 表中の数値はSIで示した。

【0035】

【表2】

添 加 物	添加濃度	抗 体 産 生	
	($\mu\text{g/ml}$)	I g M (ng/ml)	I g G (pg/ml)
対 照 (無添加) L F 分 解 物		163.2 \pm 38.2	385.4 \pm 165.3
	10	169.5 \pm 21.7	397.4 \pm 111.0
	100	431.0 \pm 109.6	1816.1 \pm 646.0
	1000	893.6 \pm 283.9	2279.7 \pm 2237.4

試験例3

この試験は、活性ペプチドの有効量を決定するために行った。

(1) 試料の調製

実施例1と同一の方法により調製した。

(2) 試験方法

ラット小腸上皮細胞IEC18 (American Type Culture Collectionから購入)を用い、試験例2と同一の方法により試験した。なお、試験試料は、種々の濃度の活性ペプチド(フラクション2)を添加した試料、およびEGFを10ng/mlと種々の濃度の活性ペプチド(フラクション2)を共に添加した試料である。(3) 試験結果

10*この試験の結果は、表3に示すとおりである。なお、結果は、実測値および無添加対照群あるいはEGFのみを添加した群の値を100%としたときの相対値で表している。

【0036】表3から明らかなように、10ng/mlのEGFと活性ペプチド(フラクション2)を25あるいは50 $\mu\text{g/ml}$ を共に添加すると、³H-チミジンの取り込み量は、EGFのみを添加した群のそれぞれ129%、125%であり、50 $\mu\text{g/ml}$ 以下の濃度でも有効であることが明らかになった。なお、他のペプチドについてもほぼ同様な結果が得られた。

【0037】

* 【表3】

添 加 物	添加濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	取 り 込 み 量 (cpm)			
		血 清 濃 度 (%)			
		2.5	5.0	7.5	10
対照 (無添加) L F 分 解 物		2462 \pm 198	2401 \pm 69	2753 \pm 400	2623 \pm 299
	1	2393 \pm 109	2432 \pm 45	2450 \pm 233	2497 \pm 223
	25	2991 \pm 125	2176 \pm 204	3454 \pm 139	3311 \pm 273
	100	4302 \pm 30	5129 \pm 379	5729 \pm 154	6304 \pm 211
	1000	5782 \pm 433	6951 \pm 346	11251 \pm 948	12568 \pm 861

参考例 (EGFの調製)

EGFは、コーエンおよびカーベントの方法 [プロスィーディングズ・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユー・エス・エイ (Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.)、第72巻、第1317ページ、1975年]、サベージおよびハーバーの方法 [アナリティカル・バイオケミストリー (Analytical Biochemistry)、第111巻、第195ページ、1981年] および西室らの方法 [ケミカル・アンド・ファーマセウティカル・ブレットイン (Chemical and Pharmaceutical Bulletin)、第33巻、第4037ページ、1985年] によりヒト尿から次のようにして調製した。

【0038】約20リットルのヒト原尿に氷酢酸1リットルを加えて酸性とし、濃塩酸を加えてpHを3.0~3.3に調整した。イオン交換樹脂Bio-Rex70 (バイオラッド社製)を氷酢酸でpHを3.1に調整し、5%酢酸で洗浄し、尿に加え、4℃で18時間攪拌

した。2~4時間放置後上澄を廃棄し、該樹脂を0.01規定塩酸で洗浄し、1モル酢酸アンモニウム (pH 8.0) でEGFを溶出させた。溶出液を凍結乾燥し、乾燥物を50mlの蒸留水に溶解し、ペプスタチン (0.5mg)、2ミリモルのアルギニン、200mgのウシ血清アルブミン (BSA) を添加した。

【0039】この溶液に1,500mlのエタノールを加えて攪拌し、30分間放置し、1,000 \times gで20分間遠心し、沈査に2ミリモルのアルギニン15mlを加え、塩酸でpHを3.0に調整し、さらに、30,000 \times g 20分間遠心し、上澄を得た。

【0040】0.05%ギ酸で平衡化したDEAEセロース (ワットマン社製) を充填したカラム (4 \times 14cm) に上記上澄を通液し、カラムに吸着せずに溶出するEGFを集め、溶出液を凍結乾燥し、乾燥物を20mlの0.05規定塩酸で溶解し、pHを1.5に調整し、3,000 \times gで30分間遠心し、上澄を得た。

【0041】Bio-Gel P-10 (バイオラッド社

11

製)を充填したカラム(4×90cm)を0.05規定塩酸で平衡化し、毎時42mlの流速で溶出させた。大部分のUV吸収物質は1.5カラム容積に溶出するが、EGFは1.7カラム容積以後に溶出した。活性分画を集め、アンモニア水でpHを6.0に調整し、凍結乾燥した。乾燥物を0.04モル酢酸アンモニウム(pH 3.9)50mlに溶解し、限外濾過して5mlに濃縮した。

【0042】CMセルロース(ワットマン社製)を充填したカラム(0.9×10cm)を0.04モル酢酸アンモニウムで平衡化し、上記濃縮液を添加し、0.04モル酢酸アンモニウムで洗浄し、のち14mlの1モル酢酸アンモニウムで溶出し、溶出液を凍結乾燥し、0.02モル酢酸アンモニウム(pH5.3)5mlに溶解した。

【0043】DE-52セルロース(ワットマン社製)を充填したカラム(0.9×10cm)を0.02モル酢酸アンモニウム(pH5.3)で平衡化し、毎時8mlの流速で溶出し、上記溶液を添加後0.02モル酢酸アンモニウムで洗浄し、0.02~0.3モル酢酸アンモニウムの濃度勾配で溶出し、3つのピーク(1, 2, 3)が得られ、EGF活性の主要なピークは1と3であり、約150~250μgのEGFを得た。

【0044】次に実施例を示してこの発明をさらに詳しく説明するが、この発明は、以下の例に限定されるものではない。

【0045】

【実施例】

実施例1

ラクトフェリン加水分解物からのペンタデカペプチドを、次の方法により製造した。ウシラクトフェリン(オレオフィナ社製)500gを、9.5リットルの水に溶解し、豚ペプシン(和光純薬工業社製)10gを添加し、37℃で6時間保持して加水分解し、のち85℃で5分間加熱して酵素を失活させた。

【0046】得られたペプシン加水分解物をMilliQ水に10mg/mlの濃度で溶解し、この溶液0.1mlを、0.5%トリフルオロ酢酸水溶液(A液)と0.041%トリフルオロ酢酸を含む90%アセトニトリル水溶液(B液)が80%対20%の混合率(A液:B液=80:20)で平衡化したODS120-T(東ソー社製)を充填したカラム(4.6mm×150mm)に、1分当たり0.8mlの流速で通液した。5分後から30分間でB液の濃度を60%まで増加する直線濃度勾配(A液対B液の比率を80対20から、A液対B液の比率を40対60)にかけた。この間の流速も0.8ml/分である。通液開始後、3分から7分(フラクション1)、7分から10分(フラクション2)、14分から18分(フラクション3)、18分から21分(フラクション4)、および21分から23分(フラ

12

クション5)の間に溶出される分画を分取した。この一連の操作を10回反復した。

【0047】前記試験例2の結果から活性ペプチドはフラクション2に含まれるので、フラクション2を濃縮し、乾燥し、MilliQ(0.1ml)に溶解し、再度前記逆相高速液体クロマトグラフィーにより、同一条件で活性ペプチドを精製した。

【0048】最終的に活性ペプチドを含む画分(精製したフラクション2)を濃縮し、乾燥し、MilliQ(0.1ml)に再度溶解し、凍結乾燥し、活性ペプチドを得た。この方法では、ウシラクトフェリンのペプシン加水分解物10mgから約150μgの割合で配列番号1のアミノ酸配列を有する活性ペプチドが得られた。

実施例2

市販のペプチド自動合成装置(ファルマシアLKBバイオテクノロジー社製、Biolynx 4170)を用い、配列番号1のアミノ酸配列を有するペンタデカペプチドを合成した。合成には、アミノ酸のαアミノ基を9-フルオレニルメトキシカルボニル(Fmoc)基で保護したFmoc-アミノ酸の3,4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ-1,2,3-ベンゾトリアジンエステル(ODhbt)またはペンタフルオロフェニルエステル(OPfp)を用い、いわゆる活性エステル法で順次C末端からペプチド鎖を延長するステップワイズエロンゲーション・ストラテジーにより目的とするペンタデカペプチドを固相法により合成した。なお、チロシン、セリンおよびスレオニンの側鎖の水酸基は第三ブチル(tBu)基で、グルタミン酸の側鎖のカルボキシル基は第三ブチルエステル(Obu)基で、リジンの側鎖は第三ブチルオキシカルボニル(Boc)基で、グルタミンおよびヒスチジンの側鎖はトリチル(Trt)基で保護した。その他のペンタデカペプチドの構成アミノ酸であるアラニン、イソロイシン、グリシンおよびプロリンの側鎖には保護を必要とする官能基はない。

【0049】この合成で用いたFmoc-アミノ酸の活性エステルは、Fmoc-Tyr(tBu)-ODhbt、Fmoc-Thr(tBu)-ODhbt、Fmoc-Ser(tBu)-ODhbt、Fmoc-Glu(Obu)-ODhbt、Fmoc-Lys(Boc)-OPfp、Fmoc-His(Trt)-OPfp、Fmoc-Ala-OPfp、Fmoc-Ile-OPfp、Fmoc-Gly-OPfp、Fmoc-Pro-OPfp(いずれもファルマシアLKBバイオテクノロジー社製)およびFmoc-Gln(Trt)-OPfp(渡辺化学工業社製)である。ペプチド固相合成用樹脂は、ヒドロキシメチルフェノキシ酢酸(HMPA)樹脂(商品名、ウルトロシンA樹脂、ファルマシアLKBバイオテクノロジー社製)を用いた。

【0050】まず、ペンタデカペプチドのC末端アミノ酸に相当するFmoc-Tyr(tBu)-ODhbt(0.5mmol)をウルトロシンA樹脂1g(ファルマシアLKBバイオテクノロジー社製)と反応させ、Fmoc-Tyr(tBu)を樹脂上に固定した。次いでこの樹脂をピペリジンを含むジメ

チルホルムアミドで洗浄し、C末端アミノ酸 (Fmoc-Tyr(tBu)) のαアミノ基の保護基 (Fmoc基) を除去した。のち目的とするペプタデカペプチドのアミノ酸配列のC末端から2番目のアミノ酸残基に相当するFmoc-Tyr(tBu)-ODbbt (0.5 mmol) を樹脂に固定されたC末端アミノ酸 (Tyr(tBu)) にカップリングさせた。以下同様にして順次所望のアミノ酸を固定した。ただし、活性エステルがペンタフルオロフェニルエステル (OPfp) の場合には、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBt, 0.5 mmol) をカップリング反応の触媒として用いた。所望のアミノ酸配列のペプチド鎖が形成された後、以下に示すように、アミノ酸側鎖の保護基の脱離とペプチドの樹脂からの脱離を同時に行い、目的とするペプタデカペプチドを得た。すなわち、Ala-Glu(OtBu)-Ile-Tyr(tBu)-Gly-Thr(tBu)-Lys(Boc)-Glu(OtBu)-Ser(tBu)-Pro-Gln(Trt)-Thr(tBu)-His(Trt)-Tyr(tBu)-Tyr(tBu)-ウルトロシンA樹脂、0.1 g とトリフルオロ酢酸・チオアニソール・エタンジチオール・アニソール (90:5:3:2)、3 ml を室温で反応させた。2時間後、樹脂を濾去し、残った樹脂をトリフルオロ酢酸 3 ml で洗浄し、濾液と洗浄液を合わせ、エーテルを10 ml 加え、析出したパウダーを遠心し集め、エーテルで洗浄し、残渣を酢酸 5 ml に溶解し、凍結乾燥し、粗ペプチド約 58 mg を得た。

【0051】得られた粗ペプチド (1 mg) を実施例1と同一の逆相高速液体クロマトグラフィーにより精製し、目的とするペプタデカペプチドの純粋品約 0.8 mg を得た。

実施例3

アミノ酸の配列を変更したことを除き、実施例2と同一の方法により、配列番号2のペプチドを合成した。このペプチドは、ヒトラクトフェリンにおいて、この発明の発明者らが見出した配列番号1のウシ由来のペプタデカペプチドに対応するペプチド部分である。

実施例4

アミノ酸の配列を変更したことを除き、実施例2と同一*

実施例10 (親水性軟膏)

実施例1と同一の方法により製造した配列番号1のペプチド	10 (g)
参考例と同一の方法により製造したEGF	0.01
白色ワセリン	250
ステアリルアルコール	220
プロピレングリコール	120
ウラリル硫酸ナトリウム	15
ラオキシ安息香酸メチル	0.25
パラオキシ安息香酸プロピル	0.15
精製水	384.59

上記成分を配合し、常法により1000 gの親水性軟膏を製造した。なお、ペプチドおよびEGF以外の原料は

実施例11 (製剤)

実施例2と同一の方法により製造した配列番号1のペプチド	50 (mg)
-----------------------------	---------

*の方法により、配列番号3のペプチドを合成した。このペプチドは、マウスラクトフェリンにおいて、この発明の発明者らが見出した配列番号1のウシ由来のペプタデカペプチドに対応するペプチド部分である。

実施例5

アミノ酸の配列を変更したことを除き、実施例2と同一の方法により、配列番号4のペプチドを合成した。このペプチドは、この発明の発明者らが見出した配列番号1のウシ由来のペプタデカペプチドの1位から7位に相当するヘプタペプチドである。

実施例6

アミノ酸の配列を変更したことを除き、実施例2と同一の方法により、配列番号5のペプチドを合成した。このペプチドは、この発明の発明者らが見出した配列番号1のウシ由来のペプタデカペプチドの1位から9位に相当するノナペプチドである。

実施例7

アミノ酸の配列を変更したことを除き、実施例2と同一の方法により、配列番号6のペプチドを合成した。このペプチドは、この発明の発明者らが見出した配列番号1のウシ由来のペプタデカペプチドの1位から11位に相当するウンデカペプチドである。

実施例8

アミノ酸の配列を変更したことを除き、実施例2と同一の方法により、配列番号7のペプチドを合成した。このペプチドは、この発明の発明者らが見出した配列番号1のウシ由来のペプタデカペプチドの3位から15位に相当するトリデカペプチドである。

実施例9

固相合成用樹脂をアミド体合成用樹脂であるウルトロシンC樹脂 (ファルマシアLKBバイオテクノロジー社製) に変更したことを除き、実施例2と同一の方法により、配列番号1のペプチドのC末端にアミド基が結合したアミド体を合成し、実施例1と同一の方法により逆相高速液体クロマトグラフィーで精製した。

いずれも市販品を用いた。

15

参考例と同一の方法により製造したEGF

結晶セルロース

コーンスターチ

タルク

ステアリン酸マグネシウム

16

0.01

170

66

11

3

1錠当たり上記の割合の各原料を均一に混合し、常法により造粒し、乾燥し、打錠し、錠剤を得た。なお、ペプチドおよびEGF以外の原料はいずれも市販品を用いた。

実施例12 (錠剤)

実施例9と同一の方法により製造した配列番号1のペプチドの

アミド体

20 (g)

参考例と同一の方法により製造したEGF

0.02

結晶セルロース

78

コーンスターチ

20

乳糖

17

ポリビニルピロリドン

3

上記各材料を均一に混合し、常法により顆粒化し、ゼラチン硬カプセル1000カプセルに充填し、カプセル剤※を調製した。なお、ペプチドのアミド体およびEGF以外の原料はいずれも市販品を用いた。

実施例13 (クリーム)

実施例5と同一の方法により製造した配列番号4のペプチド

0.5 (g)

実施例1と同一の方法により製造した配列番号1のペプチド

0.5

参考例と同一の方法により製造したEGF

0.001

ポリオキシエチレンステアリルエーテル

2.0

ポリオキシエチレンセチルエーテル

3.0

ミツロウ

4.0

セタノール

3.0

ラノリン

1.0

イソプロピルパルミテート

2.0

流動パラフィン

15.0

ポリエチレングリコールモノステアレート

0.5

バラオキシ安息香酸メチル

0.1

精製水

68.399

上記成分を配合し、常法により100gのクリームを製造した。なお、ペプチドおよびEGF以外の原料はいずれも市販品を用いた。

実施例14 (ファンデーション)

実施例6と同一の方法により製造した配列番号5のペプチド

0.5 (g)

実施例1と同一の方法により製造した配列番号1のペプチド

0.5

参考例と同一の方法により製造したEGF

0.001

ステアリン酸

2.4

モノステアリン酸プロピレングリコール

2.0

セトステアリルアルコール

0.2

液状ラノリン

2.0

流動パラフィン

3.0

ミリスチン酸イソプロピル

8.5

防腐剤

適量

カルボキシメチルセルロースナトリウム

0.2

ベントナイト

0.5

プロピレングリコール

4.0

トリエタノールアミン

1.0

酸化チタン

8.0

タルク

4.0

17

着色料

精製水

上記成分を配合し、常法により約100gのファンデーションを製造した。なお、ペプチドおよびEGF以外の*

実施例15 (乳液)

実施例3と同一の方法により製造した配列番号2のペプチド	1.0 (g)
実施例1と同一の方法により製造した配列番号1のペプチド	1.0
参考例と同一の方法により製造したEGF	0.001
自己乳化型グリセロールモノステアレート	1.1
ポリオキシエチレンセチルエーテル	1.9
MCステアリン酸	2.0
セタノール	1.0
イソプロピルミリステイト	2.0
パラオキシ安息香酸メチル	0.1
香料	0.1
精製水	89.799

上記成分を配合し、常法により100gの乳液を製造した。なお、ペプチドおよびEGF以外の原料はいずれも※

実施例16 (パック)

実施例2と同一の方法により製造した配列番号1のペプチド	0.5 (g)
実施例8と同一の方法により製造した配列番号7のペプチド	0.5
参考例と同一の方法により製造したEGF	0.001
エタノール	3.0
パラオキシ安息香酸メチル	0.1
カルボキシビニルポリマー	1.0
炭酸カルシウム	0.3
精製水	94.599

上記成分を配合し、常法により100gのパックを製造した。なお、ペプチドおよびEGF以外の原料はいずれ★

実施例17 (ボマード)

実施例7と同一の方法により製造した配列番号6のペプチド	0.5 (g)
実施例4と同一の方法により製造した配列番号3のペプチド	0.5
参考例と同一の方法により製造したEGF	0.001
モクロウ	13.0
ヒマシ油	84.799
香料	0.2

上記成分を配合し、常法により100gのボマードを製造した。なお、ペプチドおよびEGF以外の原料はいずれも市販品を用いた。

【0052】

【発明の効果】以上詳しく説明したとおり、この発明によって、従来のEGFのみを有効成分とする薬剤、化粧品および養毛剤より優れた効果を有する細胞増殖賦活化剤が提供される。

配列:

Ala Glu Ile Tyr Gly Thr Lys Glu Ser Pro Gln Thr His Tyr Tyr

1

5

10

15

配列番号: 2

配列の長さ: 15

配列の型: アミノ酸

☆【0053】

【配列表】配列番号: 1

配列の長さ: 15

40 配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列の特徴: このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド

☆

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

50 配列の特徴: このペプチド、およびこのペプチドをフラ

19

20

グメントとして含むペプチド

配列:

Ala Glu Val Tyr Gly Thr Glu Arg Gln Pro Arg Thr His Tyr Tyr

1 5 10 15

配列番号: 3

配列の長さ: 15

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

*配列の種類: ペプチド

配列の特徴: このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド

*

配列:

Ala Glu Val Tyr Gly Thr Lys Glu Gln Pro Arg Thr His Tyr Tyr

1 5 10 15

配列番号: 4

配列の長さ: 7

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列の特徴: このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列の特徴: このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド

配列:

Ala Glu Ile Tyr Gly Thr Lys Glu Ser Pro Gln

1 5 10

配列:

Ala Glu Ile Tyr Gly Thr Lys

1 5

20 配列番号: 7

配列の長さ: 13

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列の特徴: このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド

配列番号: 5

配列の長さ: 9

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列の特徴: このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド

配列:

Ala Glu Ile Tyr Gly Thr Lys Glu Ser

1 5

30

配列番号: 6

配列の長さ: 11

配列:

Ile Tyr Gly Thr Lys Glu Ser Pro Gln Thr His Tyr Tyr

1 5 10

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶

識別記号

庁内整理番号

FI

技術表示箇所

A 61 K 38/22

C 07 K 7/06

7/08

ZNA

8318-4H

8318-4H

A 61 K 37/24

(72)発明者 萩原 朋之

神奈川県横浜市旭区鶴ヶ峰1-89-33

マ・メゾンV2-C号室